动 物 学 研 究 2006，Oct. 27（5）：461－472 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

斜带石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的筛选及克隆

汲广东[1,2]，李名友[1]，周 莉[1]，桂建芳[1,*]
（1．中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉发育生物学研究中心，湖北 武汉 430072；2．中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：以斜带石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎分别作为检验组和驱动组，构建了石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎的抑制性差减杂交 cDNA 文库。以 α-*tubulin* 作为检测指标，显示差减效率分别高达 2^8 和 2^7。分别取囊胚期胚胎和尾芽期胚胎各 192 和 960 个 PCR 阳性克隆进行斑点杂交，得到 15 个囊胚期和 131 个尾芽期的斑点杂交阳性克隆。测序和数据库比对分析表明，囊胚期 15 个阳性克隆中有 11 个已知基因的 cDNA 片段和没有同源性的 4 个 cDNA 片段；而在尾芽期的 131 个阳性克隆中，有 123 个已知基因的 cDNA 片段和 8 个没有同源性的 cDNA 片段。用半定量 RT-PCR 技术分析了部分基因片段在胚胎发育过程中的表达规律和和组织分布情况。这些差异表达片段的呈现为进一步揭示石斑鱼胚胎发育、早期性别决定和性腺分化的分子机制奠定了基础。

关键词：石斑鱼；囊胚期胚胎；尾芽期胚胎；抑制性差减杂交；差异表达基因
中图分类号：Q959.483；Q785 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853（2006）05－0461－012

Screening and Analysis of Differential Expression Genes in Blastula and Tail Bud Stage Embryos in the Orange-spotted Grouper（*Epinephelus coioides*）

JI Guang-dong[1,2]，LI Ming-you[1]，ZHOU Li[1]，GUI Jian-fang[1,*]
(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology*，*Wuhan Center for Developmental Biology*，*Institute of Hydrobiology*，*Chinese Academy of Sciences*，*Wuhan* 430072，*China*；2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*，*Beijing* 100049，*China*)

Abstract: Suppression subtractive hybridization (SSH) libraries were constructed in blastula stage and tail bud stage embryos in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). The subtraction efficiency of the two subtractive cDNA libraries indicated by α-*tubulin* cDNA was approximately 2^8 and 2^7 folds，respectively. One hundred and ninety two and 960 PCR positive clones were respectively selected to perform dot blot tests；15 and 131 dot blot positive clones were obtained from SSH plasmid libraries in the blastula and tail bud stage embryos. Sequence analysis and database searches showed that there were 11 known genes and four unknown cDNA fragments in the sequenced 15 dot blot positive clones for the blastula embryos and 123 known genes and eight unknown cDNA fragments in the sequenced 131 dot blot positive clones for the tail bud embryos. RT-PCR analysis revealed the state of partially differential expression and tissue distribution of 12 cDNA fragments. Further functional studies on the differentially expressed genes screened in this study will provide more information on the molecule regulation mechanisms of embryo development，early sex determination and gonad differentiation in groupers.

Key words: Grouper；Blastula embryo；Tail bud embryo；Suppression subtractive hybridization；Differential expression genes

---

收稿日期：2006－03－06；接受日期：2006－07－21
基金项目：国家"973"计划（2004CB117401）；"863"（2003AA603410）项目资助
* 通讯作者（Corresponding author），E-mail：jfgui@ihb.ac.cn，Fax：+86－27－68780707
第一作者简介：男，博士研究生，主要从事鱼类的遗传、发育研究。

胚胎发育是一个复杂有序的过程，是基因差异表达的结果（Shi et al，2002）。受精卵从早期的快速卵裂—囊胚形成—原肠形成，到器官发生，以至幼体的出生这些形态上的有序变化，伴随着细胞分裂、细胞分化、模式形成、细胞迁移和凋亡等一系列发育事件的发生，为基因按照特定的时间和空间表达的结果，受到基因差异和选择性的表达调控。基因的差异表达从囊胚期就已经开始了，尤其在中囊胚转换点，合子基因开始表达，逐渐参与和调控细胞的分化和器官的形成。当发育到尾芽期时，已分化出现明显的尾部、神经板以及头部等区域（Kimmel et al，1995）。

斜带石斑鱼（*Epinephelus coioides*）隶属于鲈形目（Perciformes）鮨科（Serranidae）石斑鱼亚科（Epinephelinae）石斑鱼属（*Epinephelus*），为暖水性中下层鱼类，广泛分布于印度洋和太平洋的热带、亚热带海域，我国常见于南海。因斜带石斑鱼肉质鲜美、生长快、市场价格高，成为我国南方沿海地区特别是广东和福建两地网箱养殖的重要经济鱼类之一，但其人工养殖业的发展受到天然捕捞苗种不足、鱼苗成活率低、病害和饲料等许多因素的制约。最近几年，虽然在人工繁育方面已经取得初步成果，但离稳定批量生产种苗的目标尚有相当的差距（LiuFu et al，2000；Zhao et al，2003）。这除了与其具有性反转现象导致种群中雄性亲鱼较少、高龄化等因素外，也与孵化率低、出苗早而导致成活率低等有关。由于石斑鱼个体发育进程中存在先雌后雄的性反转现象，已经成为研究鱼类性别决定和分化研究的一个理想模式系统。本实验室通过构建不同发育阶段斜带石斑鱼垂体和下丘脑 SMART cDNA 文库，一些调控鱼类生殖和性腺分化的重要基因，如 *Sox*3、*GTHs*、*SL* 和 *TSH* 被克隆和鉴定（Yao et al，2003；Jia et al，2004a，b；Wang et al，2004；Li et al，2005；Zhou et al，2005，2006）。但目前对人工育苗的基础——胚胎发育方面研究非常少，仅见一些描述胚胎发育过程的文献（LiuFu et al，2001；Yeh et al，2003）。本研究通过构建斜带石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎的抑制性差减 cDNA 文库和文库筛选，呈现了一些两个发育时期差异表达的 cDNA 片段，为进一步揭示石斑鱼胚胎发育的分子调控机理，探讨其特殊生殖现象的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

石斑鱼受精卵取自广东省大亚湾水产试验中心，室温（27 ℃）发育，通过显微镜观察分别在囊胚期和尾芽期各取 200 颗胚胎进行后续实验。

1.2 石斑鱼囊胚期和尾芽期胚胎总 RNA 和 mRNA 的分离制备

胚胎在取样之后立即用过滤除菌水漂洗 3 次，以除去表面附着的杂质，然后用滤纸吸干胚胎表面的水分。胚胎总 RNA 和 mRNA 的提取分别使用 RNA Extraction Kit（Pharmacia）和 PolyATract® mRNA Isolation System Ⅲ（promega）试剂盒，操作按说明书提供的方法进行。

1.3 抑制差减杂交

按实验室已报道的方法（Xie et al，2001；Shi et al，2002），使用 PCR-Select（TM）cDNA Subtraction 试剂盒（BD Biosciences Clontech）进行差减杂交。取囊胚期胚胎和尾芽期胚胎各 2 μg PolyA + RNA 合成双链 cDNA，经过 *Rsa* Ⅰ 切消化，酚氯仿抽提后，用作 Tester cDNA 和 Driver cDNA，其中 Tester cDNA 被分成两份，分别加上 Adaptor 1 和 Adaptor 2R 接头。

Adaptor 1:
5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3′
3′-GGCCCGTCCA-5′
Adaptor 2R:
5′-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3′
3′- GCCGGCTCCA-5′

用未加接头的 Driver cDNA 和两份 Tester cDNA 分别杂交，结果差异表达的片段保持单链状态，既不与 Driver cDNA 结合也没有与自身 cDNA 结合，然后进行第二次杂交。在没有变性的条件下，混合第一次杂交的两种样品，再次加入过量的 Driver cDNA。那些在第一次杂交中保持单链的 Tester cDNA 分子重新结合，形成带有两种不同接头的双链分子。第二次杂交产物随后进行两轮 PCR 扩增差异表达的序列，第一次用 PCR Primer1 引物（5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′），第二次用 Nested Primer 1（5′-TCGAGCGGCCGCCCGGGCA-GGT-3′）和 2R（5′-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3′）引物。

1.4 差减 cDNA 质粒文库构建及插入片段大小的

鉴定

将差减杂交的第二轮 PCR 产物克隆至 pGEM-T（Promega）载体，将连接产物电转化 *E. coli* Top-10（Invitrogen），在含 X-gal/IPTG 的琼脂平板上 37 ℃培养过夜，挑取白色菌斑培养。以培养的菌液 1 μL 为模板，用 Nested PCR Primers 1 和 2R 进行 PCR 扩增，总体积为 25 μL。反应条件如下：94 ℃ 3 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，32 个循环，取 5 μL PCR 产物，琼脂糖凝胶（1.0%）电泳分析扩增产物的大小。

1.5　斑点杂交筛选差减 cDNA 文库

斑点杂交依据本实验室的方法进行（Xie et al，2001；Shi et al，2002），将石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎差减杂交的第二轮 PCR 产物用限制性内切酶 *Rsa* Ⅰ于 16 ℃保温 2 h 切去 Nested 1 和 Nested 2R 序列，玻璃奶回收酶切产物，然后采用 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit Ⅰ（Boehringer Mannheim）试剂盒进行探针标记，标记的探针分别与 1.4 中的 PCR 产物进行杂交，步骤简述如下：等量的 Nested PCR 产物与新鲜配制的 0.6 mol/L NaOH 混匀变性，在两张硝酸纤维素膜上相同的位置各点 1 μL 混合液，全部点完后，分别在用 0.5 mol/L Tris（pH 7.5）和 ddH_2O 润湿的滤纸上各放置 5 min，自然晾干，75 ℃烤膜 2 h，然后分别用阳性和阴性探针进行杂交，经过洗膜和显色后，根据相应位置显色的差异即可观察到阳性克隆的呈现。

1.6　半定量 RT-PCR 分析基因在不同胚胎发育阶段和组织中的表达

斜带石斑鱼不同胚胎发育阶段和组织的总 RNA 用 SV Total RNA Isolation System（Promega）提取。用 M-MLV 逆转录酶（Promega）和随机引物（5′-NNNNNC-3′，N = A，G，T，C）逆转录合成第一链 cDNA，以石斑鱼的 α-tubulin 基因作为对照。

2　结果和分析

2.1　差减杂交与差减效率的检测

以斜带石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎为材料，进行差减杂交。经过两轮杂交后和两轮 PCR 后，在第二次 PCR 产物中，那些在石斑鱼囊胚期和尾芽期表达没有差异的基因的拷贝数已大为减少，而差异表达的基因得到了富集。我们以 α-tubulin 作为检测指标，比较它在差减杂交前后的 cDNA 中丰度相差多少倍来估计差减杂交的效率。如图 1 所示，在囊胚期（A）未经过差减杂交的 cDNA 中，α-tubulin 基因在 PCR 18 个循环后即可见到扩增带，而在经过差减杂交的 cDNA 中直到 28 个循环才见到扩增带，说明差减杂交将石斑鱼囊胚期差异表达的 cDNA 富集了约 $2^{(28-20)}$即 256 倍，在尾芽期胚胎（B）则富集了了约 $2^{(28-21)}$即 128 倍，相应的持家基因分别降低了约 99.6%和 99.2%。

2.2　差异表达片段的筛选和序列分析

从石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎差减文库中各挑取 192 和 960 个克隆进行斑点杂交分析。取其 Nested PCR 扩增产物，每个克隆都分别点在两张膜上相对应的位置，并分别用囊胚期胚胎和尾芽期胚胎差减 cDNA 的第二次 PCR 产物标记的探针作斑点杂交。图2所示的是部分点杂交的结果。在两

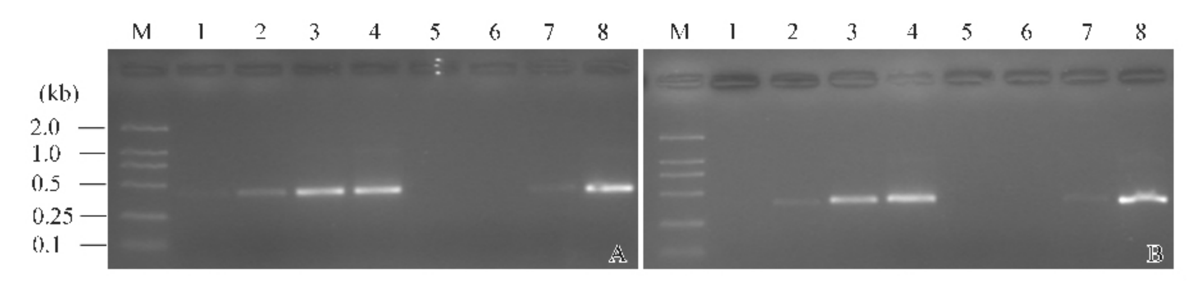


图 1　PCR 检测 α-*tubulin* cDNA 的差减效率

Fig. 1　Subtraction efficiency of α-*tubulin* cDNA of subtracted and unsubtracted cDNAs detected by PCR

A：囊胚期；B：尾芽期；1，2，3，4：未差减 cDNA 的产物；5，6，7，8：差减 cDNA 的产物；1，5：18 个循环；2，6：23 个循环；3，7：28 个循环；4，8：33 个循环；M：DL 2 000 DNA 分子量标准。

A：blastula stage（BS）；B：tail bud stage（TBS）；1，2，3，4：products of unsubtracted cDNAs；5，6，7，8：products of subtracted cDNAs；1，5：18 cycles；2，6：23 cycles；3，7：28 cycles；4，8：33 cycles；M：DL 2 000 molecular weight marker.

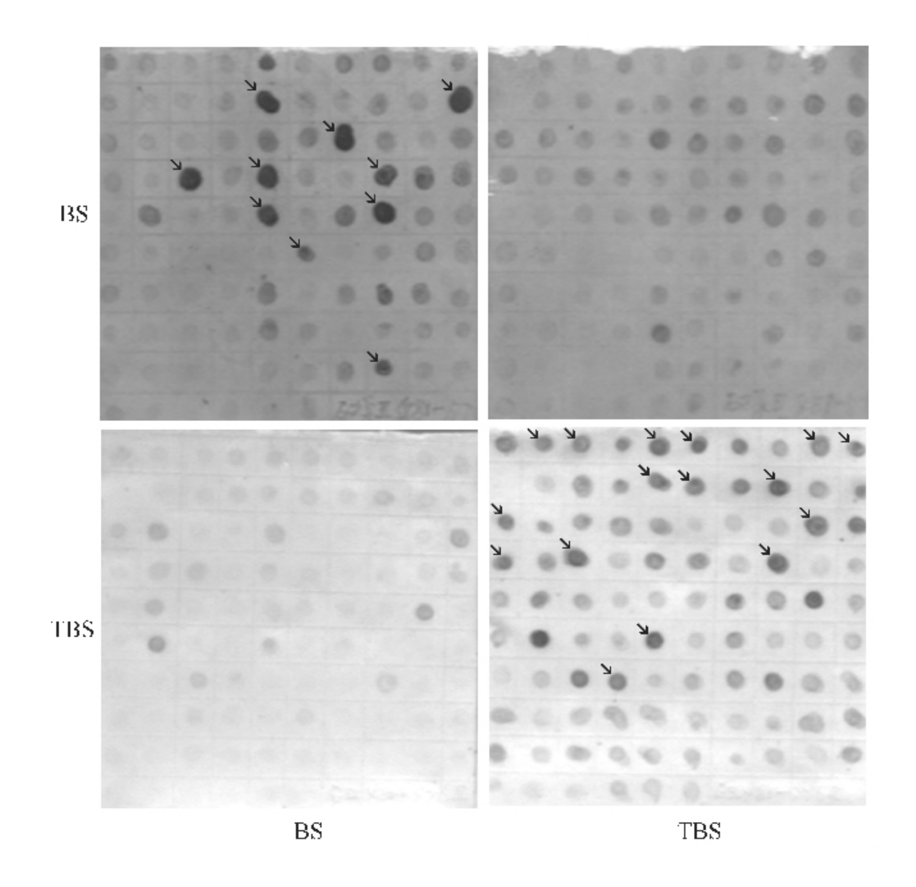


图 2 斑点杂交筛选石斑鱼囊胚期（BS）和尾芽期（TBS）差减 cDNA 文库

Fig. 2 Screening the subtractive cDNA plasmid libraries of blastula stage (BS) and tail bud stage (TBS) by dot blotting

每个克隆点在两张膜上相同的位置，分别用石斑鱼囊胚期（BS）和尾芽期（TBS）差减 cDNA 的第二次 PCR 产物作探针杂交，杂交信号相差 5 倍以上的是阳性克隆。阳性克隆用箭头标出。

Two identical membranes were hybridized with probes from blastula stage (BS) subtractive cDNA and tail bud stage (TBS) subtractive cDNA. Those whose signals on the two membranes are different by more than five folds are positive clones. The positive clones are indicated with arrows.

张膜上相同的位置，杂交信号强度相差 5 倍以上的是阳性克隆。共得到了 15 个囊胚期的和 131 个尾芽期的阳性克隆。

将杂交阳性克隆进行测序分析，结果表明（表 1）：囊胚期 15 个阳性克隆中有 11 个已知基因的 cDNA 片段和没有同源性的 4 个 cDNA 片段。在 11 个已知的 cDNA 片段中同源性大于或等于 40%的片段有 6 个，其他为同源性很低的 cDNA 片段。尾芽期的 131 个阳性克隆有 123 个已知基因的 cDNA 片段和没有同源性的 8 个 cDNA 片段。在 123 个已知的 cDNA 片段中同源性大于或等于 40%的片段有 58 个，其他为同源性很低的 cDNA 片段。8 个已知基因出现 2 次或者 2 次以上，而推断的氧化还原酶，甚至被筛选到 26 次。在已知的基因中，有与心脏和肌肉发育代谢相关的肌酸肌酶（Winnard et al，2003）、与卵壳孵化有关的孵化酶基因（Yasumasu，1992）、与膜结合 Ca^{2+} 依赖的磷脂连接蛋白（Osterloh et al，1998）、与连接桥粒钙依赖性黏附蛋白和角蛋白丝有关的基因（Kalinin et al，2004；Karashima & Watt，2002）、与钙调有关的蛋白（Porta et al，1996）和与细胞分裂和神经发育有关的 septin 2 蛋白等。

2.3 半定量 RT-PCR 验证胚胎不同发育时期差异表达的基因

随机选取了 12 个尾芽期斑点杂交阳性克隆，根据其序列设计特异引物，采用半定量 RT-PCR 方法分析了它们在胚胎发育过程中的表达规律。以 α-tubulin 基因为对照，调节各个时期的模板浓度，使其浓度相一致（图 3）。结果表明，其中 9 个克隆的 cDNA 片段在胚胎发育过程中呈现差异表达（表 1）。它们存在 3 种表达模式：第一类具有母源性转录本的差异表达基因，例如 T15 – 22（肌酸肌酶），受精卵就有微量表达，随着胚胎的发育其表达量逐渐增强；第二类是从胚胎特定时期开始表达，并一

表 1　斑点杂交阳性克隆测序 cDNA 片断的同源性查询和差异表达验证

Tab. 1　Homologue searching and differential expression conformation of the sequenced cDNA fragments from the dot blotting positive clones

克隆序号 Clone No.	同源基因 Homologue	cDNA 大小 cDNA size	克隆频数 Clones	同源物种 Species	GenBank 登录号 Accession No.	蛋白同源性 Identities	差异表达 DEC
B1	乙酰转移酶 2 Acyltransferase 2	351	1	爪蟾 *Xenopus laevis*	NP_006102	77/117（65%）	
B2	冷诱导 RNA 结合蛋白 XCIRP-1	382	1	爪蟾 *X. laevis*	AAG09816	21/34（61%）	
B3	S100 钙离子结合蛋白 A14S100CBP A14	258	1	小鼠 *Mus musculus*	AAH25607	24/80（30%）	
B4	穿膜蛋白 9 超级家族成员 2 Tm9sf2	278	1	小鼠 *M. musculus*	NM_080556	220/277（79%）	
B5	未命名蛋白 Unnamed protein product	433	1	黑青斑河豚 *Tetraodon nigroviridis*	CAF98987	118/144（81%）	
B6	C4L	425	1	猴天花病毒 *Monkeypox virus*	NP_536457	23/67（34%）	
B7	推断的蛋白 Hypothetical protein	559	1	疟原虫 *Plasmodium yoelii yoelii*	EAA22892	23/70（32%）	
B8	视黄醇结合蛋白 Retinol binding protein 2	494	1	斑马鱼 *Danio rerio*	NP_694549	110/133（82%）	
B9	阿朴脂蛋白 A—I 前体 Apolipoprotein A-I precursor	448	1	金头鲷 *Sparus aurata*	O42175	17/26（65%）	
B10	Ⅰ型胶原 alpha 2 链 Type Ⅰ collagen alpha 2 chain	286	1	大麻哈鱼 *Oncorhynchus keta*	BAB79229	81/95（85%）	
B11	ENSANGP00000021721	256	1	蚊子 *Anopheles gambiae*	XP_315475	23/71（32%）	
B12—15	无同源基因 No homology		4				
T1	未命名蛋白 Unnamed protein	579	1	小鼠 *M. musculus*	BAB32284	101/179（56%）	
T2	WW 结构结合蛋白 WW domain binding protein 3	304	1	小鼠 *M. musculus*	XP_128263	40/71（56%）	
T3	RNA 聚合酶 sigma 因子 70 RNA polymerase sigma factor 70	583	1	双岐杆菌 *Bifidobacterium longum*	NP_696589	27/74（36%）	
T4	推断的蛋白 Hypothetical protein	552	1	侧沟茧蜂病毒 *Microplitis demolitor Bracovirus*	YP_239367	35/50（70%）	
T5	推断的蛋白 Hypothetical protein	258	1	线虫 *Caenorhabditis elegans*	T16210	17/42（40%）	
T6	MdlB-like	248	1	霉浆菌 *Mycoplasma gallisepticum R*	NP_852788	23/70（32%）	
T7	推断的反转录酶 Putative reverse transcriptase	415	1	鹰嘴豆 *Cicer arietinum*	CAD59768	35/35（100%）	
T8	新蛋白 Novel protein	555	1	斑马鱼 *D. rerio*	CAI11879	50/134（37%）	R
T9	未知蛋白 Unknown protein	438	1	爪蟾 *X. laevis*	AAH60399	32/72（44%）	
T10	丝氨酸棕榈酰基转移酶 Serine palmitoyltransferase	561	1	小鼠 *M. musculus*	AAC02264	55/82（67%）	
T11	细胞色素 C 氧化酶亚单位 1 Cytochrome C oxidase subunit Ⅰ	552	1	虾虎鱼 *Coryphopterus hyalinus*	AAL16426	135/182（74%）	
T12	未命名蛋白 Unnamed protein product	557	1	黑青斑河豚 *T. nigroviridis*	CAG08869	66/134（49%）	
T13—14	半胱胺酸蛋白酶 Calpain 1	270	2	斑马鱼 *D. rerio*	AAF82808	30/88（34%）	N
T15—22	肌酸肌酶 Creatine kinase	449	8	南极白血鱼 *Chaenocephalus aceratus*	AAO24738	117/131（89%）	R

（续下表）

（接上表）

克隆序号 Clone No.	同源基因 Homologue	cDNA 大小 cDNA size	克隆频数 Clones	同源物种 Species	GenBank 登录号 Accession No.	蛋白同源性 Identities	差异表达 DEC
T23	细胞色素 C 氧化酶亚单位 3 Cytochrome C oxidase subunit Ⅲ	553	1	黑带棘鳞鱼 *Sargocentron rubrum*	NP_739925	70/182（93%）	
T24	细胞色素 *b* Cytochtome *b*	581	1	石斑鱼 *Epinephelus awoara*	BAC99039	144/167（86%）	
T25	CG11340-PA	364	1	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	NP_651861	19/51（37%）	
T26	推断的蛋白 Putative protein	261	1	SARS 冠状病毒 FRA SARS coronavirus FRA	AAP50486	13/55（23%）	
T27	ATP 酶亚单位 4 ATPase subunit 4	401	1	大鼠 *R. norvegicus*	NP_476463	91/147（61%）	
T28	孵化酶前体 1Highchoriolyticenzyme 1 recursor	312	1	青鳉 *O. latipes*	P31580	77/102（75%）	R
T29	糖原/淀粉/alpha 葡萄聚醣磷酸化酶 Glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase	590	1	微小杆菌 255—15 *Exiguobacterium* sp. 255－15	ZP_00538787	15/37（40%）	
T30	含有 TCP1 伴侣蛋白亚基 8 Chaperonin containing TCP1, subunit 8	151	1	斑马鱼 *D. rerio*	AAH50492	41/49（83%）	
T31	骨髓特异过氧化物酶 Myeloid-specific Peroxidase	591	1	斑马鱼 *D. rerio*	AAK91661	112/178（62%）	
T32	一种皮肤特异表达因子 Ictacalcin	489	1	斑点叉尾鮰 *I. punctatus*	Q91061	29/77（37%）	R
T33—34	转铁蛋白 Transferring	362	2	青鳉 *O. latipes*	BAA1090	196/121（79%）	N
T35	Tax 效应元件结合蛋白 Tax-responsive element binding protein	346	1	红原鸡 *G. gallus*	AAK52090	87/96（90%）	
T36—37	有机阴离子转移子 K9 Organic anion transporter K9	197	2	大鼠 *R. norvegicus*	AAL84229	16/43（37%）	
T38	细胞色素 C 氧化酶亚单位 Ⅱ Cytochrome C oxidase subunit Ⅱ	294	1	史氏谐鱼 *Emmelichthys struhsakeri*	NP_740078	75/97（77%）	
T39	脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 Aapurinic/apyrimidinic Endonuclease	223	1	大鼠 *R. norvegicus*	AAA21019	48/61（78%）	
T40	细胞色素 *b* Cytochrome *b*	195	1	银牙鰔 *Macrodon ancylodon*	AAP06708	38/43（88%）	
T41	Similar to RIKEN cDNA 2610017G09	339	1	大鼠 *R. norvegicus*	XP_236306	49/97（50%）	R
T42	细胞质框架蛋白质 Septin 2	630	1	斑马鱼 *D. rerio*	AAH67625	70/74（94%）	R
T43—44	核糖体蛋白 S4 Ribosomal protein S4	167	2	人 *H. sapiens*	CAA94808	53/53（100%）	
T45	膜联蛋白 Annexin max 2	324	1	青鳉 *O. latipes*	CAA72123	92/107（85%）	R
T46	推断蛋白 Hypothetical protein	518	1	粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe*	NP_594183	18/53（33%）	N
T47	ATP 合成酶 F0 亚单位 6 ATP synthase F0 subunit 6	455	1	须银眼鲷 *Polymixia japonica*	NP_073669	112/151（74%）	
T48	心肌蛋白重链 Myosin heavy chain	477	1	南极鳕 *Notothenia coriiceps*	CAC27776	94/111（84%）	
T49	钙调素 Ⅰ Calmodulin Ⅰ	251	1	刺参 *Stichopus japonicus*	P21251	83/83（100%）	
T50	包斑蛋白 Envoplakin	229	1	人 *H. sapiens*	NP_001979	40/71（56%）	R

（续下表）

（接上表）

克隆序号 Clone No.	同源基因 Homologue	cDNA 大小 cDNA size	克隆频数 Clones	同源物种 Species	GenBank 登录号 Accession No.	蛋白同源性 Identities	差异表达 DEC
T51	未命名蛋白 Unnamed protein	625	1	黑青斑河豚 *T. nigroviridis*	AG13146	40/56（71%）	
T52—77	推断的氧化还原酶 Putative oxireductase	358	26	人 *H. sapiens*	NP_689657	46/86（53%）	R
T78	翻译起始因子 2 的 γ 亚基 Translation initiation factor 2 gamm a subunit	325	1	尾滴虫 *Monocercomonas*	AAD04235	28/91（30%）	
T79—84	SocE	568	6	粘球菌 *Myxococcus xanthus*	AAF91388	59/117（50%）	
T85	依赖 NADH 的脱氢酶 1，N 链 NADH dehydrogenase Ⅰ，chain N	417	1	空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni*	NP_282694	29/108（26%）	
T86	依赖 NADH 的脱氢酶亚基 4 NADH dehydrogenase subunit 4	533	1	牙鲆 *Paralichthys olivaceus*	NP_037591	54/98（55%）	
T87	RNA 在鸟粪嘌呤的第 7 位氮上的甲基化转移酶 RNA（guanine-7-）Methyltransferase	449	1	大鼠 *R. norvegicus*	XP_214547	63/133（47%）	
T88	PAX-9	293	1	人 *H. sapiens*	AAD09487	11/25（44%）	
T89	推断蛋白 M04D8.8 Hypothetical protein M04D8.8	285	1	线虫 *C. elegans*	CAE17888	19/62（30%）	
T90—91	胎球蛋白 B Fetuin B	553	2	人 *H. sapiens*	NP_055190	58/128（45%）	
T92	推断蛋白 Hypothetical protein	382	1	隐滴虫 *Guillardia theta*	NP_113311	23/84（27%）	
T93	5′核酸酶 5′-nucleotidase	559	1	爪蟾 *X. laevis*	AAH46729	111/182（60%）	
T94	ABC 型的运输酶组分 ABC-type transporter permease component	443	1	谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*	NP_601941	17/50（34%）	
T95	氨基酸转运子 Amino acid transporter	511	1	蚕豆锈病菌 *Uromyces viciae-fabae*	CAC67419	15/38（39%）	
T96	核仁蛋白 B23/No38 Nucleolar protein B23/No38	492	1	红原鸡 *G. gallus*	AAA48990	19/34（55%）	
T97	HIV 的调控基因 Vif protein	458	1	人类免疫缺陷病毒 HIV－1	AAL09938	17/36（47%）	
T98	可溶运输家族 3 成员 2 Solute carrier family 3 member 2	376	1	斑马鱼 *D. rerio*	AAH53236	80/114（70%）	
T99	未命名蛋白 Unnamed protein	508	1	小鼠 *M. musculus*	BAC34054	15/39（38%）	
T100	DNA/RNA 解旋酶超级家族Ⅱ Superfamily Ⅱ DNA/RNA helicases	496	1	红海束毛藻 *Trichodesmium erythraeum* IMS101	ZP_00074733	20/64（31%）	
T101	组蛋白 H2A，Z 型 H2AZ histone	557	1	人 *H. sapiens*	NP_002097	74/74（100%）	
T102	热激蛋白 90α Heat shock protein 90 alpha	446	1	墨西哥脂鲤 *Astyanax mexicanus*	AAO52675	33/37（89%）	
T103	GTP 酶激活蛋白 2 GTPase activating protein 2	453	1	人 *H. sapiens*	NP_006624	61/75（81%）	
T104	核糖体蛋白 L7 Ribosomal protein L7	346	1	斑点叉尾鮰 *Ictalurus punctatus*	AAK95131	127/156（81%）	
T105	Ⅱ型角蛋白 Type Ⅱ keratin E3	401	1	斑马鱼 *D. rerio*	CAC87008	99/117（84%）	
T106	Ⅰ型角蛋白 Type Ⅰ keratin	526	1	金头鲷 *S. aurata*	AAB67167	104/148（70%）	

（续下表）

（接上表）

克隆序号 Clone No.	同源基因 Homologue	cDNA 大小 cDNA size	克隆频数 Clones	同源物种 Species	GenBank 登录号 Accession No.	蛋白同源性 Identities	差异表达 DEC
T107	一种蛋白溶解酶 Rhoptry protein	477	1	鼠疟疾寄生虫 *Plasmodium yoelii yoelii*	EAA16907	20/71（28%）	
T108	推断的转座酶 SECY 蛋白 Putative preprotein translocase SECY protein	542	1	拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	NP_180711	15/33（45%）	
T109	推断蛋白 Hypothetical protein	530	1	大鼠 *R. norvegicus*	XP_232249	32/69（46%）	
T110	PADI-H protein	524	1	人 *H. sapiens*	AAF82265	11/24（45%）	
T111	Polo 样激酶 Polo-like kinase	435	1	人 *H. sapiens*	NP_005021	102/149（68%）	
T112	KIAA0672 gene product	548	1	人 *H. sapiena*	NP_055674	105/156（67%）	
T113	α5（Ⅳ）链胶原质 Collagen alpha 5（Ⅳ）chain	413	1	小鼠 *M. musculus*	I48304	34/41（82%）	
T114	推断蛋白 Putative protein	338	1	拟南芥 *A. thaliana*	CAB85554	17/50（34%）	
T115	去氧亥普酸合成酶 Deoxyhypusine synthase isoform c	521	1	斑马鱼 *D. rerio*	NP_037539	75/135（55%）	
T116	泛素接合酶 Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	544	1	斑马鱼 *D. rerio*	AAH47863	90/98（91%）	
T117	原肠胚特异的蛋白 Gastrula specific embryonic protein 1	492	1	石斑鱼 *Epinephelus coioides*	AAN02166	66/67（98%）	
T118	线粒体柠檬酸合成酶 Mitochondrial citrate synthase	545	1	剑鱼 *Xiphias gladius*	AAR98861	157/159（98%）	
T119	前酚类氧化酶 Prophenoloxidase	544	1	美国白蛾 *Hyphantria cunea*	AAC34256	13/33（39%）	
T120	推断蛋白 Putative protein	546	1	拟南芥 *A. thaliana*	NP_198297	16/42（38%）	
T121	通透酶 Permeases	523	1	革兰氏阴性好氧菌 *Novosphingobiu maromaticivorans*	ZP_00093882	12/40（30%）	
T122	甘氨酰 tRNA 合成酶 Glycyl-tRNA synthetase	327	1	小鼠 *M. musculus*	Q9CZD3	162/179（90%）	
T123	输入因子 α4 Importin alpha 4	559	1	爪蟾 *X. laevis*	CAD89698	26/36（72%）	
T124—131	无同源基因 No homology		8				

B：囊胚期；T：尾芽期；N：非差异表达；R：RT-PCR 实验检测为差异表达。

B: blastula stage; T: tail bud stage; N: no differential expression; R: differential expression confirmed by RT-PCR.

DEC: differential expression confirmation.

直维持稳定含量的基因，例如 T28（孵化酶），从原肠期开始转录，而后一直维持比较高的含量；第三类是仅在胚胎发育特定阶段表达的基因，如 T52－77，从原肠期开始转录，到心脏出现期一直都维持在很高的水平，但到出膜期前后则基本上检测不到转录产物（图 3）。

2.4 半定量 RT-PCR 检测部分差异片段的组织特异性

采用 RT-PCR 方法同时分析了上述 12 个差异 cDNA 片段的组织特异性分布（图 4a，b）。结果表明，主要有 3 种表达模式。一种是在某一组织中大量表达，其他组织中很少或没有表达，如 T15－22（肌酸肌酶）大量表达于肌肉中，在心脏只有少量表达，在成熟的性腺中则仅有痕量表达，在其他组织，如肝、肾、脾、脂、脑、成熟卵巢、变性期卵巢中都没有表达；第二种是一种广谱性的组织表达模式，如 T52－77（推断的氧化还原酶）在各个组织中都有表达且表达量在同一水平；第三种是在组织中基本无表达或痕量表达，如 T28（孵化酶）仅在脑和成熟卵巢中有痕量表达。另外，T42（septin 2）呈现出一种独特的组织表达模式，可检测到两个转录本。分子量较小的转录本 septin 2a 存在于所有被检测的组织中，分子量较大的转录本 septin 2b 特异地存在于垂体、下丘脑、端脑、中脑、小脑和延脑中。测序结果表明，它们是由于不同剪接方式造成的。

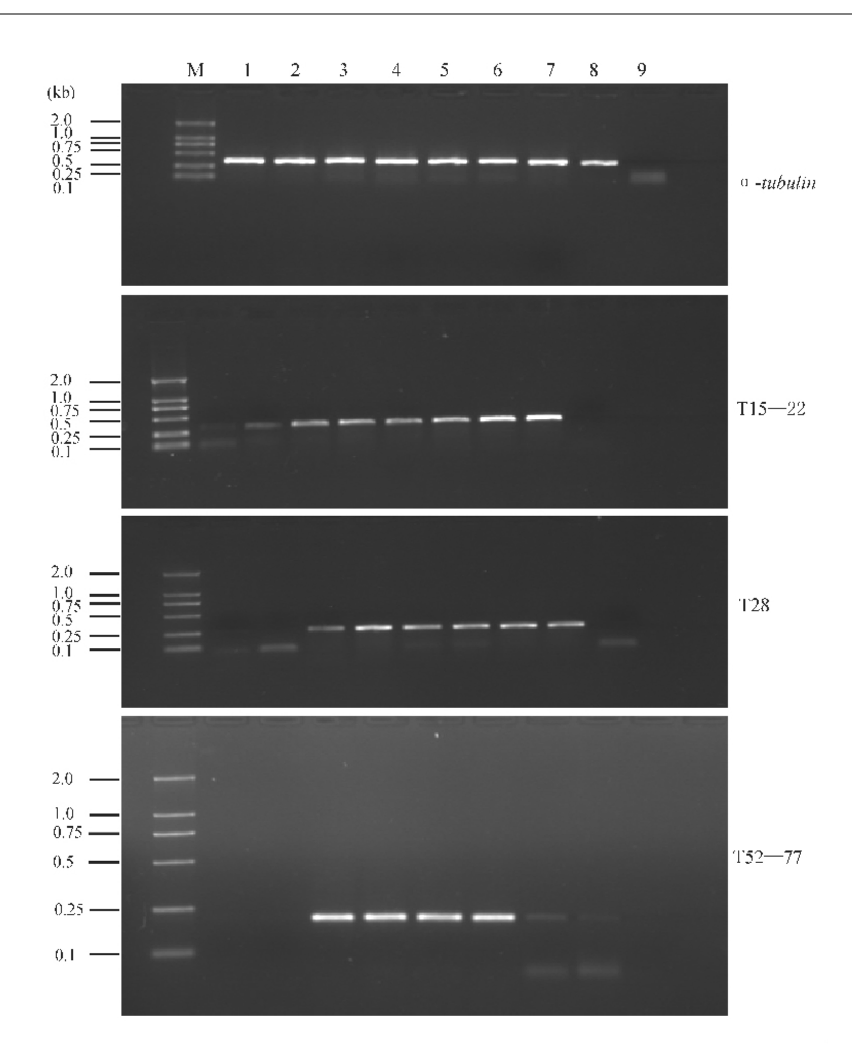


图 3　RT-PCR 证实部分 cDNAs 在石斑鱼胚胎发育过程中差异表达

Fig. 3　Confirmation of partially differentially expressed cDNAs in tail bud stage during embryogenesis of *Epinephelus coioides* by RT-PCR

1：成熟卵；2：囊胚期；3：原肠期；4：神经胚期；5：尾芽期；6：心脏分化期；7：出膜前期；8：出膜期；9：阴性对照；M：DL 2 000 DNA 分子量标准。

1: mature oocyte; 2: blastula; 3: gastrula; 4: neurula; 5: tail bud stage; 6: heart formation; 7: before hatching; 8: hatching; 9: negative control; M: DL 2 000 DNA molecular weight marker.

3　讨　论

抑制性差减杂交技术（SSH）是近年来建立的一种寻找差异表达基因的十分有效的方法(Diatchenko et al,1996;Wen et al,2001,2003;Xie et al,2003;Liu et al,2005;Du et al,2005)。相对于其他方法，它具有假阳性率低和能够克隆到低丰度基因两大优势。因此，在生物的许多研究领域都得到了广泛的应用。例如，与银鲫卵母细胞成熟和分裂相关基因的克隆（Xie et al，2001）、鱼类抗病相关基因的克隆（Zhang et al，2003a，b；Du et al，2005）、影响猪肌肉生长和肉质的重要基因的克隆（Xu et al，2003）、人肝癌细胞急性低氧及低氧习服两种状态下差异表达基因的克隆（Wang et al，2003）等都用到了抑制性差减技术。在克隆动物胚胎发育中差异表达基因方面，仅见本实验室构建的银鲫心跳期胚胎和尾芽期胚胎以及银鲫原肠期胚胎和尾芽期胚胎的抑制差减文库的报道（Shi et al，2002；Liu et al，2005）。不同的物种可能都具有其特定的发育模式，斜带石斑鱼为海水鱼，并且其个体发育过程中存在着天然性反转现象，其胚胎发育模式和早期性别决定可能与淡水鱼银鲫有较大差异。因此，本研究通过构建斜带石斑鱼囊胚期胚胎和尾芽期胚胎的抑制性差减 cDNA 文库，结合组织表达谱式分析，希望获得一些重要的调控石斑鱼胚胎发育、性别决定和性腺分化的重要基因。

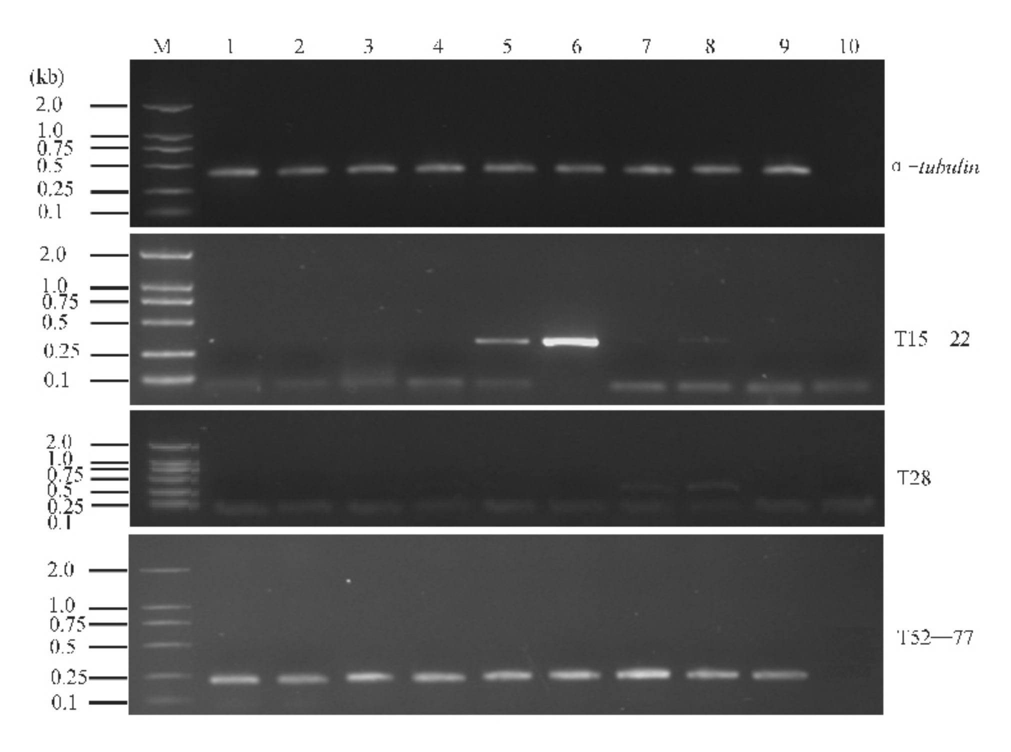


图 4a RT-PCR 检测部分 cDNAs 的组织表达分布

Fig. 4a Tissue distribution of partially differentially expressed cDNAs in tail bud stage by RT-PCR

1：肝；2：肾；3：脾；4：脂；5：心；6：肌；7：脑；8：成熟卵巢；9：变性期卵巢；10：阴性对照；M：DL 2 000 DNA 分子量标准。

1: liver; 2: kidney; 3: spleen; 4: fat; 5: heart; 6: muscle; 7: brain; 8: ovary; 9: gonads at three weeks during feeding 17α-MT; 10: negative control; M: DL 2 000 DNA molecular weight marker.

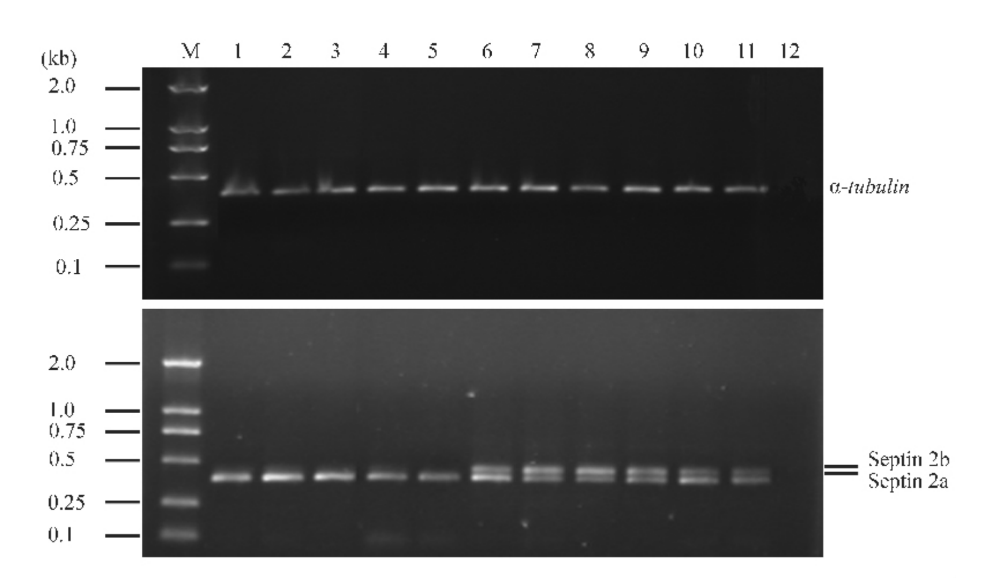


图 4b cDNA 片段（T41）的组织表达分布

Fig. 4b Tissue distribution of differentially expressed gene (T41) by RT-PCR

1：肝；2：肾；3：脾；4：心；5：肌；6：垂体；7：下丘脑；8：端脑；9：中脑；10：小脑；11：延脑；12：阴性对照；M：DL 2 000 DNA 分子量标准。

1: liver; 2: kidney; 3: spleen; 4: heart; 5: muscle; 6: pituitary; 7: hypothalamus; 8: telencephalon; 9: midbrain; 10: cerebellum; 11: medulla oblongata; 12: negative control; M: DL 2 000 DNA molecular weight marker.

通过本研究，我们筛选到一些重要候选基因。譬如，孵化酶基因（T28）、高丰度的推断的氧化还原酶（T52 – 77）、与细胞分裂和神经发育有关的 septin 2 蛋白（T42）、一个含独特 C2 结构域的卵巢特异表达基因（*EcOC2*）等。孵化酶基因在调控卵子孵化方面具有重要作用，同时由于孵化酶具有特异降解卵壳的特性，可望用于鱼类基因转移和核移植。斜带石斑鱼在受精后 18 h（27 ℃）即出膜，由于此时石斑鱼胚胎发育程度低，对外界环境敏感，鱼苗的成活率非常低。因此，利用基因工程的方法控制该基因的表达，可能对提高石斑鱼的出苗率和成活率有重要的意义。与其他鱼类相比，石斑鱼孵化酶的表达谱式略有差异。石斑鱼孵化酶从原肠期才开始转录，这一点与青鳉类似（Inohaya et al，1995），之后表达量升高，直到出膜期，而在青鳉中出膜前期的两种孵化酶都开始下降。银鲫的孵化酶基因从尾芽期才开始转录（Liu et al，2005）。作为在组织中都广谱表达的氧化还原酶，是维持生物体基本代谢的酶类，但在石斑鱼胚胎发育中有独特的表达模式，仅在原肠期到心脏出现期这一阶段大量表达，之后表达量降低。由于从原肠期到心脏出现期这一段时期内是基因大量表达，器官原基开始形成的重要阶段。我们所筛选到的这一高丰度片段，说明在这一阶段的基本代谢旺盛，与此时众多发育事件的发生是紧密相连的。具有两个剪接体的 septin 2 蛋白，是研究鱼类脑发育的重要标记基因。我们还筛选到一个具有独特 C2 结构域的新基因 *EcOC2*（T8）。*EcOC2* 从原肠期开始表达，并一直存在于石斑鱼胚胎发育的整个过程中。随后的 RT-PCR 和 Western-blot 实验均表明，它是一个卵巢特异表达的基因。免疫荧光分析表明，*EcOC2* 蛋白位于卵母细胞放射带和颗粒细胞之间，它可能参与了体细胞和卵子之间的相互通讯过程（Ji et al，2006）。对 *EcOC2* 生理功能和发育行为的进一步研究将有助于我们理解卵母细胞和周围体细胞潜在的相互作用的机制。

参考文献：

Diatchenko L，Lau YFC，Campbell AP，Chenchik A，Moqadam F，Huang B，Lukyanov S，Lukyanov K，Gurskaya N，Sverdlov ED，Siebert PD. 1996. Suppression subtractive hybridization：A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries［J］. *Proc Natl Acad Sci USA*，**93**：6025 – 6030.

Du CS，Zhang QY，Dong CW，Miao DL，Gui JF. 2005. Construction and analysis of the subtractive cDNA library of flounder cells induced with inactive fish rhabdovirus［J］. *High Technol Lett*，**15**（1）：79 – 82.［杜昌升，张奇亚，董彩文，苗大利，桂建芳. 2005. 灭活病毒诱导牙鲆传代细胞差减 cDNA 文库的构建及分析. 高技术通讯，**15**（1）：79 – 82.］

Inohaya K，Yasumasu S，Ishimaru M，Ohyama A，Iuchi I，Yamagami K. 1995. Temporal and spatial patterns of gene expression for the hatching enzyme in the teleost embryo，*Oryzias latipes*［J］. *Dev Biol*，**171**：374 – 385.

Ji GD，Zhou L，Wang Y，Xia W，Gui JF. 2006. Identification of a novel C2 domain factor in ovaries of orange-spotted grouper（*Epinephelus coioides*）［J］. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*，**143**（3）：374 – 483.

Jia HB，Zhou L，Wang Y，Li CJ，Gui JF. 2004a. cDNA Cloning，expression and localization of somatolactin by immunofluorescence histochemistry method in grouper *Epinephelus coioides*［J］. *High Technol Lett*，**14**：76 – 82.［贾海波，周　莉，汪　洋，李创举，桂建芳. 2004a. 斜带石斑鱼生长催乳素基因全长 cDNA 的克隆、表达及其免疫荧光组化分析. 高技术通讯，**14**：76 – 82.］

Jia HB，Zhou L，Shi YH，Gui JF. 2004b. Molecular cloning and evolutionary implications of growth hormone/prolactin family gene cDNAs in grouper *Epinephelus coioides*［J］. *Zool Res*，**25**：242 – 248.［贾海波，周　莉，石耀华，桂建芳. 2004b. 斜带石斑鱼生长激素/催乳素家族基因 cDNA 的分子克隆及其进化意义. 动物学研究，**25**：242 – 248.］

Kalinin AE，Idler WW，Marekov LN，McPhie P，Bowers B，Steinert PM，Steven AC. 2004. Co-assembly of envoplakin and periplakin into oligomers and Ca^{2+}-dependent vesicle binding：Implications for cornified cell envelope formation in stratified squamous epithelia［J］. *J Biol Chem*，**279**（21）：22773 – 22780.

Karashima T，Watt FM. 2002. Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments［J］. *J Cell Sci*，**115**（Pt 24）：5027 – 5037.

Kimmel CB，Ballard WW，Kimmel SR，Ullmann B，Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development in the zebrafish［J］. *De Dyn*，**203**：253 – 310.

Li CJ，Zhou L，Wang Y，Hong YH，Gui JF. 2005. Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common α，FSHβ and LHβ in groupers［J］. *Mol Cell Endocrinol*，**233**（1 – 2）：33 – 46.

Liu J，Shi YH，Yin J，Gui JF. 2005. Screen of differentially expressed genes between gastrula embryos and tail bud embryos in gynogenetic gibel carp（*Carassius auratus gibelio*）［J］. *Acta Genet Sin*，**32**（3）：253 – 263.［刘　军，石耀华，尹　隽，桂建芳. 2005. 雌核发育银鲫原肠期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的呈现. 遗传学报，**32**（3）：253 – 263.］

LiuFu YZ，Wang YX，Huang GG，Liu XC，Lin HR. 2000. Enrichment culture and natural spawning of broodstock *Epinephelus coioides*［J］. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*，**39**（6）：81 – 85.［刘付永忠，王云新，黄国光，刘晓春，林浩然. 2000. 斜带石斑鱼亲鱼强化培育及自然产卵研究. 中山大学学报（自然科学版），**39**（6）：81 – 85.］

LiuFu YZ，Wang YX，Huang GG，Liu XC，Lin HR. 2001. Embryonic and larval development of red-spotted grouper（*Epinephelus akaara*）［J］. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*，**40**（1）：81 – 84.［刘付永忠，王云新，黄国光，刘晓春，林浩然. 2001. 自然产卵的赤点石斑鱼胚胎及仔鱼形态发育研究. 中山大学学报（自然科学版），**40**（1）：81 – 84.］

Osterloh D, Wittbrodt J, Gerke V. 1998. Characterization and developmentally regulated expression of four annexins in the killifish medaka [J]. *DNA Cell Biol*, **17** (10): 835 - 847.

Porta AR, Bettini E, Buiakova OI, Baker H, Danho W, Margolis FL. 1996. Molecular cloning of ictacalcin: A novel calcium-binding protein from the channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, **41** (1 - 2): 81 - 9.

Shi YH, Liu J, Xia JH, Gui JF. 2002. Screen for stage-specific expression genes between tail bud stage and heartbeat beginning stage in embryogenesis of gynogenetic silver crucian carp [J]. *Cell Res*, **12** (2): 133.

Wang JH, Shan YJ, Cong YW, Wu LJ, Yuan XL, Zhao ZH, Wang SQ, Chen JP. 2003. Identification of differentially expressed genes of acute hypoxia-treated HepG2 cells and hypoxiaacclimatized HepG2 cells [J]. *Acta Physiol Sin*, **55** (3): 324 - 330. [王金惠, 善亚君, 从玉文, 吴岚军, 苑晓玲, 赵振虎, 王升启, 陈家佩. 2003. 人体肝癌细胞急性低氧及低氧习服差异表达基因分析. 生理学报, **55** (3): 324 - 330.]

Wang Y, Zhou L, Yao B, Li CJ, Gui JF. 2004. Differential expression of thyroid-stimulating hormone subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted groupers [J]. *Mol Cell Endocrinol*, **220**: 77 - 88.

Wen JJ, Xie J, Liu SG, Gui JF. 2001. Differential expression and characterization analysis of a new gene with WD domains in fish oogenesis [J]. *Sci Chn*, **44**: 541 - 553.

Wen JJ, Xie J, Gui JF. 2003. cDNA cloning and characterization of a novel SNX gene differentially expressed in previtellogenic oocytes of gibel carp [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **136** (3): 451 - 461.

Winnard P, Cashon RE, Sidell BD, ayda ME. 2003. Isolation, characterization and nucleotide sequence of the muscle isoforms of creatine kinase from the Antarctic teleost Chaenocephalus aceratus [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **134**: 651 - 667.

Xie J, Wen JJ, Chen B, Gui JF. 2001. Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, **271**: 109 - 116.

Xie J, Wen JJ, Yang ZA, Wang HY, Gui JF. 2003. Cyclin A2 is differentially expressed during oocyte maturation between gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp [J]. *J Exp Zool*, **295** (1): 1 - 16.

Xu DQ, Zhang YB, Xiong YZ, Gui JF, Jiang SW, Su YH. 2003. Construction of forward and reverse subtracted cDNA libraries between muscle tissue of Meishan and Landrace pigs [J]. *Acta Genet Sin*, **30** (7): 668 - 672. [徐德全, 张义兵, 熊远著, 桂建芳, 蒋思文, 苏玉虹. 2003. 梅山猪与长白猪肌肉组织间正反向消减 cDNA 文库的构建. 遗传学报, **30**: 668 - 672.]

Yao B, Zhou L, Gui JF. 2003. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *sox*3 gene in grouper *Epinephelus coioides* [J]. *High Technol Lett*, **13** (5): 74 - 81. [姚 波, 周 莉, 桂建芳. 2003. 斜带石斑鱼 *sox*3 基因 cDNA 的克隆及其时空表达特征分析. 高技术通讯, **13** (5): 74 - 81.]

Yasumasu S, Yamada K, Akasaka K, Mitsunaga K, Iuchi I, Shimada H, Yamagami K. 1992. Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development [J]. *Dev Biol*, **153** (2): 250 - 258.

Yeh SL, Dai QC, Chu YT, Kuo CM, Ting YY, Chang CF. 2003. Induced sex change, spawning and larviculture of potato grouper, *Epinephelus tukula* [J]. *Aquaculture*, **228**: 371 - 381.

Zhang YB, Shi YH, GUI JF. 2003a. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **27** (1): 113 - 118. [张义兵, 石耀华, 桂建芳. 2003a. 鱼类培养细胞抗病毒差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, **27** (1): 113 - 118.]

Zhang YB, Zhang QY, Xu DQ, Hu CY, Gui JF. 2003b. Identification of antiviral-relevant genes in the cultured fish cells induced by inactivated virus [J]. *Chn Sci Bull*, **48** (6): 581 - 588.

Zhao HH, Liu XC, LiuFu YZ, Wang YX, Lin HR. 2003. Seasonal cycles of ovarian development and sermn sex steroid levels of female grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Acta Sci Natu Univ Sunyatseni*, **42** (6): 56 - 59, 63. [赵会宏, 刘晓春, 刘付永忠, 王云新, 林浩然. 2003. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化. 中山大学学报 (自然科学版), **42** (6): 56 - 59, 63.]

Zhou L, Wang Y, Yao B, Li CJ, Ji GD, Gui JF. 2005. Molecular cloning and expression pattern of 14 kDa apolipoprotein in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **142**: 432 - 437.

Zhou L, Yao B, Xia W, Li CJ, Wang Y, Gui JF. 2006. EST-based identification of genes expressed in the hypothalamus of male orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Aquaculture*, **256**: 129 - 139.